

学位論文題名

革新的ワクチンの創製を目指した
デリバリーシステムの機能解析と癌免疫療法への展開

学位論文内容の要旨

【背景】

近年、AIDS から癌に至る様々な病気に対抗できる治療法として、DNA ワクチンが注目されている。しかしながら、現状では期待した効果が得られず臨床応用されるまでには至っていない。この最大の障壁となっているのが、樹状細胞への効率的な遺伝子導入システムの開発である。

当研究室では、タンパク質や核酸等の細胞内送達を目的として、独自のキャリアーである多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (MEND) の開発を進めている。MEND は様々な機能性素子を組み込むことにより体内動態・細胞内動態の制御が可能である。特に、膜透過性ペプチドであるオクタアルギニン (R8) を修飾した R8-MEND は、培養細胞において高い遺伝子発現活性を示すことが明らかにされており、DNA ワクチン開発のためのデリバリーシステムとして有用であることが期待される。本研究では、R8-MEND を基盤とした革新的ワクチンの創製を目指し、段階的にデリバリーシステムの機能解析を行った。また、これと平行して免疫効果の評価系を確立し、免疫誘導能の評価を行うことにより、それぞれのデリバリーシステムがワクチンとして機能しうるものであるか検証を行った。

【結果及び考察】

1. R8 修飾リポソームによる抗原タンパク質の送達

これまでに当研究室において、抗原を封入したリポソーム膜の表面を R8 で修飾することにより、効率的に MHC class I (MHC-I) 抗原提示を誘導できることが示されている。そこで本研究では、R8 による抗原提示誘導メカニズムの解明に焦点を当て、オクタリジン (K8) を対照に抗原提示能及び細胞内動態の比較解析を行った。ovalbumin (OVA) を封入したリポソームをマウス骨髄由来樹状細胞にパルスし抗原提示量を評価した結果、驚くべきことに、R8 修飾リポソームのみで投与量依存的な MHC-I 抗原提示が認められ、K8 修飾リポソームでは見られなかった。そこでさらに詳細な検討を行ったところ、両リポソームの取り込み量及びエンドソーム脱出能は同程度であった。また、プロテアソームによる OVA の分解量についても評価を行ったが、顕著な違いは認められなかった。さらに、樹状細胞の成熟化も同程度であった。興味深いことに、空の R8 リポソームを OVA 封入リポソームと同時に添加することにより、R8 リポソームだけでなく K8 リポソームによる抗原提示も増加した。一方、空の K8 リポソームでは顕著な影響は認められなかった。これらの結果から、R8 による MHC-I 抗原提示の誘導はその正電荷によるものではなく、抗原の分解以降の過程で R8 特有の抗原提示促進作用が関与している可能性が示唆された。

2. デリバリーシステムへの TLR リガンドの組み込みによる細胞性免疫誘導能の増強と癌に対する有効性の評価

続いてこのリポソームのワクチン効果を *in vivo* で評価した。抗原に対する特異的かつ強力な細胞障害性 T 細胞 (CTL) を誘導することを目的として、Toll-like receptor (TLR) リガンドの共封入を試みた。その結果、TLR3 のリガンドである合成二本鎖 RNA (Poly I:C) の共封入によって、R8 リポソームの CTL 誘導能が著しく増強された。次に、Poly I:C 封入量の最適化を行い抗癌効果について評価を行った。R8 リポソームを免疫したマウスに OVA 発現癌細胞を移植し予防的な抗癌効果を評価した結果、R8 リポソームを投与した群においては、細胞性免疫誘導アジュバントとして知られるフロイト完全アジュバントを上回る癌の増殖抑制効果が認められた。さらに、先に癌を移植したマウスに免疫を行った場合にも癌の増殖が抑制され、治療的なワクチンとしても有効であることが示唆された。

3. 樹状細胞への siRNA の送達及び SOCS1 ノックダウンによる免疫増強効果

次に、siRNA の送達について検討を行った。ベクターは、siRNA の送達のために培養細胞系で最適化された di-lamellar-MEND (D-MEND) を用いた。さらに、suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) を標的として免疫効果の評価を行った。SOCS1 はサイトカインシグナル伝達における負のフィードバック分子として機能していることから、免疫の誘導に合わせて SOCS1 を一過的にノックダウンすることにより、ワクチンの効果を増強可能であると期待される。GAPDH を標的とした評価では、D-MEND を用いることにより、RNAi 用の導入試薬として広く用いられている Lipofectamine 2000 を上回る RNAi 効果が得られた。続いて SOCS1 に対する siRNA を導入し IFN- γ により SOCS1 の発現を誘導した結果、87.5% の SOCS1 発現抑制及び、TNF- α , IL-6 の産生増加が観察された。さらに、SOCS1 をノックダウンした樹状細胞を免疫したマウスでは、有意に強い癌の増殖抑制効果が認められた。

4. 樹状細胞への遺伝子送達を目指した新規デリバリーシステム開発の試み

最後に、遺伝子送達における細胞内動態の定量的解析と、主に核移行に焦点を当てた新規デリバリーシステムの開発を試みた。まず、遺伝子の投与量と発現量の関係が非線形性を示すことに着目し、その要因を解明するために細胞内動態の解析を行った。その結果、非線形性は細胞への取り込み・エンドソーム脱出・核移行過程を含む細胞内動態ではなく、それ以降の転写・翻訳過程を含む核内動態に起因するものであることを見出した。さらに、核膜孔を介さない膜融合による核移行戦略に基づいた新規 MEND を用いることにより、核移行だけでなく核内動態の効率も改善されることを明らかにした。

これらの結果は、非ウイルスベクターの開発において、細胞内動態の制御と同時に核内動態を制御することの重要性を示唆する結果である。今後は核移行の改善と核内動態制御の両面から、さらなる遺伝子発現効率の上昇を目指したベクター開発が期待される。

【まとめ】

1. R8 による MHC-I 抗原提示の誘導はその正電荷によるものではなく、また、そのメカニズムに細胞質への抗原送達過程は関与しないことを明らかにした。
2. R8 を用いたタンパク質のデリバリーシステムに TLR リガンドを組み込むことにより、*in vivo* での CTL 誘導能を増強することに成功し、さらに、このシステムが癌に対するワクチンとして有用であることを明らかにした。
3. D-MEND を用いて樹状細胞の SOCS1 をノックダウンすることにより、樹状細胞のワクチン効果を増大させることに成功した。
4. 非ウイルスベクターの開発において、細胞内動態の制御と同時に核内動態を制御することの重要性を見出した。

これらの結果より、これまで培養細胞において様々な解析結果に基づき最適化が行われてきたデリバリーシステム（MEND）が樹状細胞へも適用可能であり、さらにそれらは癌免疫療法におけるワクチンとして機能しうることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 原 島 秀 吉
副 査 教 授 松 田 正
副 査 准教授 紙 谷 浩 之
副 査 教 授 小 暮 健 太 朗 (京 都 薬 科 大 学)

学 位 論 文 題 名

革新的ワクチンの創製を目指した

デリバリーシステムの機能解析と癌免疫療法への展開

近年、AIDS から癌に至る様々な疾患に対抗できる治療法として DNA ワクチンが注目されているが、樹状細胞への効率的な遺伝子導入システムの開発が障壁となり臨床応用には至っていない。本研究では、独自の遺伝子送達システムであるオクタアルギニン修飾多機能性エンベロープ型ナノ構造体 (R8-MEND) を基盤とした革新的ワクチンの創製を目指し、デリバリーシステムの機能解析と免疫誘導能の評価を行った。

まず、オクタアルギニン (R8) を修飾したリポソームの抗原タンパク質の送達について、マウス骨髄由来樹状細胞を用いて検討した。その結果、R8 リポソームでは効率的に MHC class I (MHC-I) 提示が誘導されたのに対し、比較対象として用いたオクタリジン (K8) リポソームでは提示が認められなかった。興味深いことに、両リポソームの取り込み・エンドソーム脱出・プロテアソームによる抗原の分解過程に差異は認められなかったが、抗原を含まない R8 リポソームを同時に添加した場合 K8 リポソームの抗原提示が促進された。よって、R8 リポソームによる MHC-I 抗原提示誘導は R8 に特有の作用であり、また、そのメカニズムに細胞質への抗原送達過程は関与しないことを見出した。これらの結果は、R8 修飾キャリアーのワクチンとしての利点を明らかにした初めてのものである。

この R8 リポソームのワクチンとしての効果を *in vivo* で評価した結果、Toll-like receptor 3 のリガンドである合成二本鎖 RNA (Poly I:C) を抗原と共封入することにより、CTL 誘導能を著しく増強し、フロイト完全アジュバントを上回る抗癌効果を誘導することに成功した。よって、この R8 修飾キャリアーが癌ワクチンとして有用であることが証明された。

さらに DNA ワクチンの前段階として、樹状細胞への核酸医薬 (siRNA) 送達について検討した。siRNA 送達のために培養細胞系で最適化された R8 修飾 di-lamellar-MEND により、市販試薬で最強の Lipofectamine 2000 を上回る

RNAi 効果を得ることに成功した。また、サイトカインシグナル伝達における負のフィードバック分子として機能している SOCS1 に対する siRNA を用いることで、インターフェロン- γ 刺激時のシグナル伝達の増強、及びサイトカイン産生の増加に成功した。さらに、SOCS1 をノックダウンした樹状細胞を免疫したマウスでは、有意に強い癌の増殖抑制効果が認められた。樹状細胞において、非ウイルスキャリアーを用いて強力な RNAi 効果を誘導し、さらにワクチン効果を増強することに成功した報告は本研究が初めてである。

さらに DNA ワクチン開発に重要な遺伝子送達時の細胞内動態の定量的解析を行い、新規キャリアー開発を試みた。培養細胞において、遺伝子の投与量と発現量の関係が非線形性を示すことに着目し解析を行った結果、非線形性は細胞への取り込み・エンドソーム脱出・核移行過程を含む細胞内動態ではなく、それ以降の転写・翻訳過程を含む核内動態に起因するものであることが示唆された。このことから、樹状細胞へ効率的に遺伝子導入可能なキャリアーを開発するためには、細胞内動態制御と核内動態制御の両面からの効率改善が重要であることが示唆された。そこで、樹状細胞への遺伝子送達効率の改善を目的として、核膜孔を介さない膜融合による核移行戦略に基づいた新規 MEND について解析したところ、核移行だけでなく核内動態の効率も改善されたことを明らかにした。

以上、本研究は、R8-MEND が樹状細胞へも適用可能であり、それらは癌免疫療法におけるワクチンとしても有用であることを示す優れた研究成果である。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格があるものと認める。